

Kadar Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Sebagai Prediktor Demam Berdarah Dengue Pada Hari Ketiga

Myrna Alia¹, Yulia Iriani¹, Zarkasih Anwar¹, Theodorus²

1. Bagian Ilmu Kesehatan Anak, FK Universitas Sriwijaya/RSUP Moh. Hoesin, Palembang 30126, Indonesia
2. Unit Statistik dan Epidemiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang 30126, Indonesia

Abstrak

Demam berdarah dengue (DBD) pada fase awal sakit memiliki gejala yang tidak khas dan mirip dengan demam dengue (DD) atau demam karena infeksi lain (*other febrile illness*/OFI). Adanya perembesan plasma merupakan penanda DBD yang terjadi setelah fase awal ini. TNF- α merupakan salah satu sitokin yang berperan dalam mekanisme perembesan plasma pada DBD. Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk melihat hubungan antara TNF- α dengan DBD. Penelitian ini merupakan suatu case control yang dilakukan pada bulan Maret-September 2011 pada RS Moh Hoesin, RSUD Palembang Bari dan RS Muhammadiyah Palembang dan Puskesmas Pembina. Kelompok kasus terdiri dari subjek dengan DBD dan kelompok kontrol subjek non DBD (DD dan OFI) sebanyak dua kali lipat yang dimatching menurut usia dan jenis kelamin. Pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan TNF- α dilakukan pada hari ke tiga demam. Sebanyak 54 subjek yang terdiri dari 18 subjek dengan DBD dikelompokkan sebagai kasus dan masing-masing 18 subjek dengan DD dan OFI sebagai kontrol. Rerata kadar TNF- α pada DBD, DD dan OFI adalah $52,71 \pm 22,58$ pg/mL, $39,79 \pm 9,57$ pg/mL dan $35,98 \pm 8,07$ pg/mL dan uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p=0,002$; uji Kruskal-Wallis). Titik potong kadar TNF- α yang optimal adalah 37,6 pg/mL. Uji Fisher menunjukkan adanya hubungan yang bermakna antara kadar TNF- α dan DBD dibanding DD ($p=0,027$; OR=8), OFI ($p=0,00$; OR=28) dan non DBD/DD+OFI ($p=0,00$; OR=14,145). Terdapat hubungan yang bermakna antara kadar TNF- α dan DBD.

Kata kunci: TNF- α , DBD, DD, OFI, studi kasus kontrol.

Abstract

Early symptoms of dengue haemorrhagic fever (DHF) are unspecific and similiar to dengue fever (DF) or other febrile illness (OFI). Plasma leakage which is the characteristic of DHF occurs later. TNF- α is one of cytokines plays role in plasma leakage in DHF. Different studies to investigate the role of TNF- α in DHF showed various results. This study aim was to determine the association between TNF- α and DHF. A case control study was held from March-September 2011 in Moh. Hoesin Hospital, Palembang BARI Hospital and Muhammadiyah Hospital and Puskesmas Pembina Palembang. Case group consisted of DHF subject. Each case was matched with two controls. Controls were matched with cases for age and sex. Blood samples for TNF- α examination were collected on the third day of fever. Data analysis was performed using SPSS 16 programme. Fifty-four subjects consisted of 18 subjects with DHF in case group and 18 subjects each with the diagnosis of DF and OFI in control group. Mean TNF- α concentration of DHF, DF and OFI group was 52.71 ± 22.58 pg/mL, 39.79 ± 9.57 pg/mL and 35.98 ± 8.07 pg/mL respectively and were statistically different ($p=0.002$; Kruskal-Wallis test). The optimal cut-off level of TNF- α was 37,6 pg/mL. Fisher's exact test showed significant association between TNF- α level and DHF compared to DF (OR=8; $p=0.027$), OFI (OR=28; $p=0.00$) and non DHF (OR=14.145; $p=0.00$). There was a significant association of TNF- α level and DHF.

Keywords: TNF- α , DHF, DF, OFI, case control study

1. Pendahuluan

Demam berdarah dengue (DBD) pada fase demam, biasanya 3 hari pertama demam, ditandai dengan gejala

yang tidak khas dan mirip dengan gejala demam dengue (DD) maupun infeksi oleh patogen lain yang istilahnya disebut sebagai *other febrile illness* (OFI). Fase ini baru kemudian diikuti oleh fase kritis (hari 3-7, biasanya hari

ke 4 atau 5) dimana demam turun dan terjadi perembesan plasma yang dapat mengakibatkan hipovolemia dan terjadi renjatan yang merupakan gejala yang membedakan DBD dengan DD maupun OFI.¹

Telah diketahui bahwa terjadinya perembesan plasma disebabkan oleh aktivasi endotel. Makrofag yang terinfeksi akan menjadi aktif dan melepaskan sitokin di antaranya *tumor necrosis factor α* (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), IL-6 dan *platelet activating factor* (PAF).^{2,3} TNF- α merupakan salah satu sitokin yang masih terus diteliti mengenai perannya pada infeksi dengue baik secara *in-vitro*, klinis maupun pada model hewan. Salah satu contoh penelitian *in vitro* adalah penelitian oleh Chen *et al.* (2000) pada makrofag/monosit yang diinfeksi dan diukur berbagai sitokin termasuk TNF- α . Pada penelitian ini didapatkan produksi TNF- α mulai meningkat pada awal infeksi (≤ 24 jam), mencapai kadar puncak pada hari kedua post infeksi dan kemudian menurun.⁴ Vitarana *et al.* (1991) pertama kali menemukan bahwa kadar TNF- α pada penderita DBD lebih tinggi dibandingkan pada penderita demam dengue.⁵ Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa kadar TNF- α meningkat pada: DBD derajat IV dibanding DD pada penelitian Chaturvedi *et al.*,⁶ penderita yang meninggal dibanding yang bertahan hidup,⁷ dan anak-anak yang dirawat inap dibanding dengan yang tidak rawat inap.⁸ Namun hasil yang berbeda didapatkan oleh Priyadarshini *et al.* dimana kadar TNF- α penderita infeksi dengue lebih rendah dari kontrol.⁹

Penelitian mengenai kadar TNF- α member hasil kemaknaan statistik yang bervariasi sehingga diduga adanya peran dari faktor genetik. Penelitian Restrepo *et al.* (2008) di Puerto Rico menunjukkan bahwa etnis Afro-Kolombia memiliki kadar TNF- α yang lebih tinggi dibandingkan dengan etnis Mestizo, akan tetapi perbandingan kadar TNF- α dari demam dengue terhadap DBD lebih besar secara bermakna pada etnis Mestizo.¹⁰ Vejbaesya *et al.* (2009) mengidentifikasi bahwa subjek yang memiliki haplotipe TNF-4 dengan substitusi G/A pada posisi -238 lebih berisiko mengalami DBD saat infeksi sekunder.¹¹

Temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa TNF- α memang memiliki peranan penting dalam patofisiologi DBD, dan kemungkinan bahwa peningkatan kadarnya sudah dapat dideteksi pada hari-hari pertama sakit/setelah infeksi.^{4,6} Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui hubungan kadar TNF- α pada manifestasi berat (DBD) bila dibandingkan dengan non DBD (DD dan OFI) yang memiliki manifestasi ringan. Pengambilan sampel dilakukan pada fase demam (hari ke 3 sakit) sebelum terjadi perembesan plasma.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu studi *case control* dilakukan di poliklinik, instalasi rawat darurat dan

bangsal infeksi Bagian Ilmu Kesehatan Anak RS Moh Hoesin, RSUD Palembang BARI, RS Muhammadiyah dan Puskesmas Pembina Palembang mulai Maret 2011-September 2011.

Subjek penelitian adalah anak tersangka infeksi dengue dengan demam hari ketiga yang setelah diikuti dan kemudian didiagnosis akhir sesuai dengan gambaran klinis dan laboratorium DBD, DD atau OFI. Diagnosis demam dengue (DD) ditegakkan bila ditemui demam akut 2-7 hari disertai disertai dua atau lebih gejala sakit kepala, nyeri retroorbital, mialgia/artralgia, ruam, manifestasi perdarahan. Diagnosis DBD ditegakkan berdasarkan kriteria WHO 1997. Pemilihan sampel dilakukan setelah diagnosis akhir ditegakkan. Kelompok kasus adalah subjek dengan diagnosis DBD dan kelompok kontrol adalah subjek dengan DD dan OFI yang dicari sebanyak 2 kali lipat dari kelompok kasus dan dilakukan *matching* menurut usia dan jenis kelamin.

Penderita dengan penyakit kronis, keganasan atau kelainan bawaan seperti: penyakit jantung, diabetes melitus, penyakit autoimun seperti SLE, artritis rematoid dan yang sedang makan obat-obatan seperti antivirus, anti hipertensi dan lain-lain dikeluarkan dari penelitian ini.

Pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan TNF- α dan darah rutin dilakukan pada hari ke tiga demam. Hemoglobin, hematokrit dan hitung trombosit dilakukan setiap hari selama pemantauan sesuai dengan standar penatalaksanaan DBD. Pemeriksaan kadar TNF- α dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang dengan menggunakan metode ELISA. Reagen yang dipakai adalah Quantikine oleh R&D Systems USA dengan dosis deteksi minimal 0,5-5,5 pg/mL dan rerata deteksi minimal 1,6 pg/mL.

Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16. Analisis perbandingan rerata kadar TNF- α antara OFI, DD, DBD dilakukan dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis. Titik potong kadar TNF- α dicari dengan memakai kurva ROC (*receiver operating characteristic*). Analisis hubungan kadar TNF- α dengan DBD dilakukan dengan menggunakan *Fisher exact test*. Pada analisis ini dilakukan dengan melihat hubungan antara kadar TNF- α pada DBD bila dibandingkan dengan non DBD (DD+OFI).

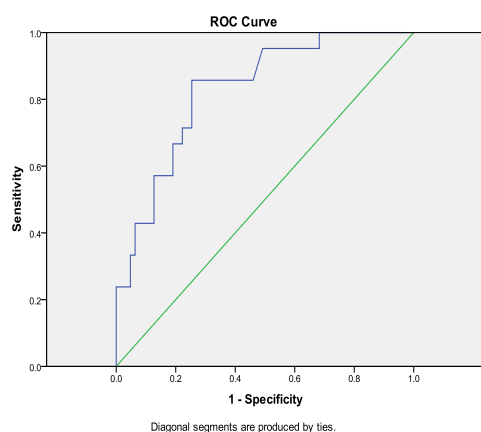
3. Hasil

Selama periode pengambilan data Maret 2011-September 2011 didapatkan sebanyak 54 subjek yang memenuhi kriteria *matching* menurut usia dan jenis kelamin pada penelitian *case control* ini yang terdiri dari: 18 subjek yang didiagnosis sebagai DBD sebagai kelompok kasus dan kontrol yang terdiri dari 18 subjek dengan diagnosis OFI dan 18 orang dengan diagnosis DD.

Tabel 1 menunjukkan karakteristik penderita serta gambaran klinis dan gambaran laboratorium yang didapatkan pada penelitian ini. Rerata usia yang didapatkan adalah $8,1 \pm 2,81$ tahun untuk DBD, $7,98 \pm 2,73$ tahun untuk DD dan $7,88 \pm 2,77$ tahun untuk OFI. Rerata lama masing-masing $4,11 \pm 0,96$ hari untuk DBD, $3,61 \pm 0,7$ hari untuk DD dan $3,2 \pm 0,57$ hari untuk OFI. Nyeri kepala dan nyeri otot merupakan gejala yang paling sering ditemukan pada subjek penelitian, namun tidak spesifik untuk infeksi dengue.

Perbandingan antara rerata kadar TNF- α masing-masing kelompok adalah $57,71 \pm 22,58$ pg/mL pada DBD, $39,79 \pm 9,57$ pg/mL untuk DD dan $35,98 \pm 8,07$ pada OFI dan didapatkan perbedaan bermakna kadar TNF- α pada masing-masing diagnosis ($p=0,002$, uji Kruskal-Wallis).

Titik potong kadar TNF- α yang paling optimal yang didapatkan dari kurva ROC adalah 37,6 pg/mL dengan sensitivitas 85,6% dan spesifisitas 74,6% seperti yang ditunjukkan pada gambar 1 dibawah ini.



Gambar 1. Kurva receiver operating characteristics (ROC) untuk menentukan titik potong kadar TNF- α

Tabel 1. Karakteristik, gejala klinis dan laboratorium subjek penelitian.

| Karakteristik | Diagnosis Akhir | | |
|-------------------------------|-----------------|------------|------------|
| | DBD (n=18) | DD (n=18) | OFI (n=18) |
| Sex, n (%) | | | |
| Laki-laki | 8 (44) | 8 (44) | 8 (44) |
| Perempuan | 10 (56) | 10 (56) | 10 (56) |
| Usia, tahun | 8,10 (2,8) | 7,9 (2,7) | 7,9 (2,7) |
| Rerata (SD) | | | |
| Status gizi, n (%) | | | |
| Gizi baik | 10 (56) | 7 (39) | 14 (78) |
| Gizi kurang | 8 (44) | 11 (61) | 4 (22) |
| Lama demam, hari, rerata (SD) | 4,11 (0,96) | 3,61 (0,7) | 3,2 (0,57) |
| Nyeri kepala | 18 (100) | 16 (89) | 11 (61) |
| Nyeri otot | 18 (100) | 17 (94) | 10 (56) |

| | | | |
|--------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| Nyeri perut | 16 (89) | 15 (83) | 4 (23) |
| Batuk | 4 (22) | 4 (22) | 11 (61) |
| Flushing | 2 (11) | 6 (33) | 0 (0) |
| Hepatomegali | 4 (22,2) | 1 (6) | 0 (0) |
| Tourniquet test | 14 (77,8) | 16 (88,9) | 9 (50) |
| Perdarahan kulit spontan | 11 (61,1) | 4 (22,2) | 1 (5,6) |
| Mimisan | 4 (22,2) | 5 (27,8) | 1 (5,6) |
| Gusi berdarah | 0 (0) | 2 (11,1) | 1 (5,6) |
| Memar di bekas tempat suntikan | 4 (22,2) | 1 (5,6) | 0 (0) |
| Trombosit | 41333 (24328,6) | 65944,4 (43373,17) | 214111,1 (60385,9) |
| mm ³ (SD) |) |) |) |
| Peningkatan Ht vol% (SD) | 32,03 (11,7) | 8,97 (5,11) | 6,41 (3,86) |
| Leukosit/mm ³ (SD) | 4950 (2647,8) | 5044,4 (2366,98) | 9200 (3247,62) |

Analisis dengan uji Fisher lalu dipakai untuk melihat hubungan kadar TNF- $\alpha \geq 37,6$ pg/mL dengan kejadian. Tabel 2 dibawah ini menunjukkan bahwa penderita tersangka infeksi dengue yang memiliki kadar $\geq 37,6$ pg/mL memiliki kemungkinan lebih besar untuk mengalami DBD.

Tabel 2. Hubungan kadar TNF- α dengan DBD.

| Kadar TNF- α | Diagnosis | | | |
|---------------------|-----------|--------------|----------------|-----------------|
| | DBD | DD | OFI | DD+OFI |
| $\geq 37,6$ pg/mL | 16 (88,9) | 9 (50) | 4 (22,2) | 13 (36,1) |
| $< 37,6$ pg/mL | 2 (11,1) | 9 (50) | 14 (77,8) | 23 (63,8) |
| OR(CI) | | 8 (1,4-45,4) | 28 (4,4-176,8) | 14,1 (2,8-71,5) |
| p^* | | 0,027 | 0,00 | 0,00 |

4. Pembahasan

Penelitian ini merupakan suatu penelitian *case-control* untuk membandingkan kadar TNF- α pada subjek DBD dan non DBD.

Karakteristik penderita umumnya tidak begitu jauh berbeda bila dibandingkan dengan penelitian- penelitian lain.¹²⁻¹⁷ Rerata trombosit pada subjek penelitian ini lebih rendah, baik pada DBD, DD dan OFI yaitu $41,333/ \text{mm}^3$, $65,944,44/\text{mm}^3$ dan $214.111,11/\text{mm}^3$. Oishi *et al.* mendapatkan hasil rerata trombosit yang lebih tinggi pada DBD dan DD yaitu $113.300/\text{mm}^3$ dan $153.100/\text{mm}^3$. Wang *et al.* (2007) mendapatkan hasil rerata trombosit pada DBD $186.000/\text{mm}^3$ dan DD $78.100/\text{mm}^3$.¹⁸ Hasil yang berbeda ini dikarenakan rerata pada penelitian ini merupakan rerata trombosit terendah sedangkan rerata yang disajikan pada Oishi *et al.* merupakan rerata

trombosit pada saat masuk dan Wang *et al.* memakai rerata trombosit pada 1-3 hari setelah dirawat.

Terdapat berbagai penelitian yang meneliti kadar TNF- α pada hari yang berbeda. Restrepo *et al.* (2008) yang membandingkan kadar TNF- α pada subjek dengan dua etnis yang berbeda (Afro-Kolombia dan Mestizo) mengambil sampel untuk pemeriksaan TNF- α sebanyak lima kali dan mendapatkan bahwa pada etnis afro-kolombia puncak kadar TNF- α pada hari ke 2, 4 (hanya pada penderita DBD), 8 dan 12 dan pada etnis Mestizo pada hari ke 3, 5 dan 12 baik pada DBD dan DD.¹⁰ Chakravarti dan Kumaria (2005) membandingkan kadar TNF- α dan IFN- γ pada hari ke 1-4 dan 5-8 demam dan mendapatkan bahwa kadar TNF- α pada penderita dengan demam hari 5-8 lebih tinggi.¹⁹ Nguyen *et al.* (2004) mengambil sampel untuk pemeriksaan sitokin sebanyak dua kali yaitu pada fase akut (antara hari ke 3-7 setelah onset demam) dan fase konvalesen (antara hari 8-19 setelah onset demam).²⁰ Perbandingan antara rerata kadar TNF- α masing-masing kelompok diagnosis diuji dengan Kruskal-Wallis. Rerata masing-masing diagnosis adalah 57,71 \pm 22,58 pg/mL pada DBD, 39,79 \pm 9,57 pg/mL untuk DD dan 35,98 \pm 8,07 pada OFI dan didapatkan perbedaan bermakna kadar TNF- α pada masing-masing diagnosis ($p=0,002$). Chakravarti dan Kumaria (2006) membandingkan kadar TNF- α dan IFN- γ pada DBD, DD dan kontrol sehat juga mendapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kadar TNF- α pada subjek DD dibandingkan dengan kontrol (220,65 \pm 212,95 vs 10,12; $p<0,001$) dan pada subjek DBD dibandingkan dengan kontrol (239,4 \pm 173,37 vs 10,12; $p<0,001$).¹⁹

Kurva ROC digunakan untuk menentukan titik pada konsentrasi mana TNF- α memiliki keseimbangan sensitivitas dan spesifisitas yang paling optimal untuk menentukan bahwa kadar TNF- α dikatakan berubah. Titik potong yang dipilih adalah 37,6 pg/mL dengan sensitivitas 85,6% dan spesifisitas 74,6%. Nilai referensi yang tidak jauh berbeda sebesar 41 pg/mL didapatkan pada penelitian oleh Braga *et al.* (2001) walaupun nilai ini didapat dengan cara yang berbeda yaitu dengan menjumlahkan rerata kadar TNF- α kontrol+[SD kontrol $\times t_{n-1}; \alpha=0.025$]²¹

Analisis dengan uji Fisher lalu dilakukan untuk melihat hubungan kadar TNF- $\alpha \geq 37,6$ pg/mL dan DBD bila dibandingkan dengan DD, OFI dan non DBD (DD dan OFI). Hasil analisis dengan uji Fisher pada kelompok DBD dan DD didapatkan hubungan bermakna ($p=0,027$) dan *odds ratio* yang didapat adalah 8 yang menunjukkan bahwa subjek dengan kadar TNF- $\alpha \geq 37,6$ pg/mL akan memiliki risiko 8 kali lebih besar untuk terkena DBD. Hasil yang serupa didapatkan pada kelompok DBD dan OFI ($p=0,00$) dengan OR sebesar 28. Analisis hubungan kadar $\geq 37,6$ pg/mL dengan subjek DBD pada perbandingannya dengan non DBD

(DD dan OFI) didapatkan hubungan bermakna ($p=0,00$). *Odds ratio* yang didapatkan sebesar 14,154 yang menunjukkan bahwa subjek yang memiliki kadar TNF- $\alpha \geq 37,6$ pg/mL akan memiliki risiko 14,154 kali lebih besar untuk terkena DBD. Green *et al.* (1999) pada penelitiannya menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna rerata TNF- α pada kelompok DBD, DD dan OFI. Namun, proporsi sampel yang terdeteksi TNF- α lebih besar pada anak dengan DBD daripada DD dan OFI. Uji Fisher menunjukkan perbedaan proporsi TNF- α yang terdeteksi secara statistik bermakna pada saat demam turun (*day of defervescence*) dan terdapat tren yang mengarah bermakna sebelum demam turun.²²

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh diatas disimpulkan bahwa kadar TNF- $\alpha \geq 37,6$ pg/mL memiliki hubungan yang bermakna dengan DBD dan kadar ini dapat dipakai sebagai prediktor untuk membedakan DBD dan non DBD.

Daftar Acuan

1. WHO. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva 2009; 16
2. Soegijanto S, Sustini F, Wirahjanto. Epidemiologi Demam Berdarah Dengue. Dalam: Soegijanto S. Demam Berdarah Dengue. Edisi 2. Airlangga University Press. Surabaya. 2006:1-10
3. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology: Immune System In Health and Disease. 5th edition. Garland Publishing. New York. 2001: 97-100.
4. Chen YC, Wang SY. Activation of Terminally Differentiated Human Monocytes/Macrophages by Dengue Virus: productive Infection, Hierarchical Production of Innate Cytokines and Chemokines, and Syneristic Effect of Lipopolysaccharide. J Virol 2002; 76(19):9877-9887.
5. Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. Ceylon Med J. 1991 Jun;36(2):63-5.
6. Chaturvedi UC, Ragupathy R, Pacsa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, *et.al.* Shift from a Th1-Type Response to Th2-Type in Dengue Haemorrhagic Fever; Curr.Sci. 1999; 76: 63-69
7. Suharti C., van Gorp ECM, Dolmans WMV., Setiati TE., Hack CE, Djokomoeljanto RJ., van der Meer JWM. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. Eur. Cytokine Netw. 2003; 14(3): 172-177
8. Kuno G, Bailey RE. Cytokine Responses to Dengue Infection among Puerto Rican Patients. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89(2): 179-182.

9. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. Clinical Findings and Pro-Inflammatory Cytokines in Dengue Patients in Western India: A Facility-Based Study. *PLoS ONE* 2010; 5 (1): e8709
10. Restrepo BN, Ramirez RE, Arborelda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ. Serum Levels of Cytokines in Two Ethnic Groups with Dengue Virus Infection. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79 (5): 673-77
11. Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Endy T P., Mammen MP., Green S, Libraty DH., Ennis F A., Rothman AL., Stephens HAF.. TNF and LTA Gene, Allele, and Extended HLA Haplotype Associations with Severe Dengue Virus Infection in Ethnic Thais. *JID* 2009;199:1442-8
12. Oishi K, Mapua CA., Carlos CC., Cinco-Abanes MTDD., Saito M, Inoue S, Morita K *et al.*. Dengue and other Febrile Illnesses among Children in the Philippines. *Dengue Bull.* 2006; 30:26-34
13. Witayathawornwong P. 2005. DHF in infants, late infant and older children: a comparative study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 36(4): 896-900.
14. Kalayanaroj S, Vaughn D. W, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, *et al.* Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness. *JID.* 1997; 313-321
15. Pusat Data dan Surveilans Kementerian Kesehatan RI. Demam Berdarah Dengue di Indonesia tahun 1968-2009. *Buletin Jendela Epidemiologi.* 2010; 2: 1-14.
16. Koraka P., Suharti C., Setiati T. E., Mairuhu A. T. A., Van Gorp E., Hack C. E., *et al.* Kinetics of Dengue Virus-Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection. *J Clin Microbiol.* 2001 December; 39(12): 4332-4338.
17. Phuong CXT, Nhan NT, Kneen R, Thuy PTT, Thien CV, Nga NTT, *et al.* Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the World Health Organization classification system helpful? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; 70(2):172-179
18. Wang L, Chen RF, Liu JW, Yu HR, Kuo HC, and Yang KD.. Implications of Dynamic Changes among Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Membrane TNF Receptor, and Soluble TNF Receptor Levels in Regard to the Severity of Dengue Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77(2): 297-302
19. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating Levels of Tumour Necrosis Factor- α & Interferon- γ in patients with Dengue & Dengue Haemorrhagic Fever During an Outbreak. *Indian J Med Res.* 2006; 123: 25-30
20. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, Lin CF, Yeh TM, Do QH, Vu TQ, Chen LC, Huang JH, Lam TM, Liu CC, Halstead SB. Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15; 189(2): 221-32.
21. Braga ELA, Moura P, Pinto LMO, Ignácio SRN, Oliveira MJC, Cordeiro MT, *et.al.* Detection of Circulant Tumor Necrosis Factor- α , Soluble Tumor Necrosis Factor p75 and Interferon- γ in Brazilian Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(2): 229-232.
22. Green S., Vaughn DW, Kalayanaroj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, *et al.*. Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity. *J Infect Dis.* 1999; 179:755-62